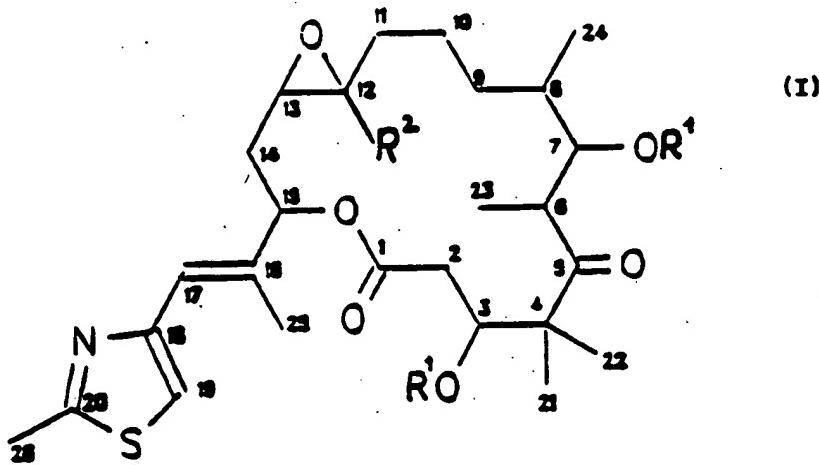


(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07D 493/04, C12P 17/18 A01N 43/90, A61K 31/425 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C12P 17/18, C12R 1:00)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/10121  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)
---	----	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02656	(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1992 (19.11.92)	(81) Bestimmungstaaten: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).
(30) Prioritätsdaten: P 41 38 042.8 19. November 1991 (19.11.91) DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungstaaten außer US</i> ): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). CIBA-GEIGY AG [CH/CH]; Klybeckstr. 141, CH-4002 Basel (CH).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; BEDORF, Norbert [DE/DE]; GERTH, Klaus [DE/DE]; REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).	

(54) Titel: EPOTHILONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE AS MEDICAMENTS AND AS PLANT PROTECTING AGENTS

(54) Bezeichnung: EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL



(57) Abstract

Epothilones having general formula (I), a process for preparing the same and epothilone-containing agents are disclosed.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Epothilone der allgemeinen Formel (I), Herstellungsverfahren sowie Epothilone enthaltende Mittel.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

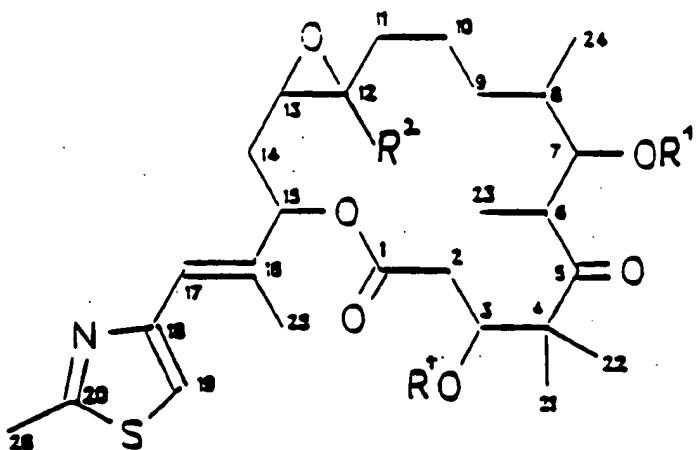
Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbügeln der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Botsuana	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BP	British Post	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HG	Ungarn	P	Polen
BZ	Belize	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RJ	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RS	Russische Föderation
CF	Zentralafrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Sidn
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SI	Schweden
CH	Schweiz	KX	Kosovo	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sovjet Union
CS	Tschechoslowakei	LS	Luxemburg	TD	Tschad
DE	Deutschland	MC	Mongolei	TG	Togo
DK	Dänemark	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
ES	Spanien	ML	Malta	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MR	Montenegro	VN	Vietnam

- 1 -

**EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL  
UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL**

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkanoyl, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 1/2 Mg<sup>2+</sup> oder 1/2 Ca<sup>2+</sup> bedeutet und R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

- 2 -

1H-NMR-Daten			13C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\* Zuordnung vertauschbar

- 3 -



FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(\text{M} - \text{H})^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

v: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

DC:  $R_F = 0,75$

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t = 5,4 \text{ min}$

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

- 4 -

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,22	dd	1	170,5
2b	2,53	dd	2	39,4
3	4,24	dd	3	72,9
6	3,28	m	4	53,2
7	3,75	dd	5	219,8
8	1,73	m	6	43,1
9a	1,4	m	7	74,3
9b	1,5	m	8	36,6
10a	1,4	m	9	30,9
10b	1,4	m	10	22,5
11a	1,42	m	11	32,3
11b	1,7	m	12	61,3
12	-		13	61,7
13	2,8	dd	14	32,4
14a	1,9	ddd	15	76,9
14b	2,1	ddd	16	137,5
15	5,41	dd	17	120,0
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,2
21 <sup>a</sup>	1,05	s	20	165,1
22 <sup>a</sup>	1,36	s	21 <sup>a</sup>	19,7
23	1,15	d	22 <sup>a</sup>	21,5
24	0,92	d	23	13,7
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,7
27	1,28	s	26	19,0 (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

<sup>a</sup> Zuordnung vertauschbar

- 5 -

 $C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^+$ UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

 $\nu = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 \text{ cm}^{-1}$ DC:  $R_F = 0.75$ DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

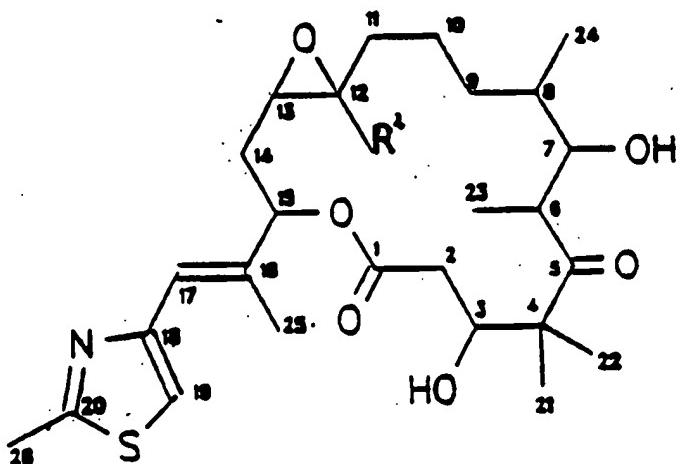
Detektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune AnfärbungHPLC:  $R_t = 6.3 \text{ min}$ Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel:



- 6 -

woin R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z.B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

- Administrationsform: oral
- Dosis 0.5 bis 200 mg für einen Menschen mit 70 kg Normalgewicht
- Verwendungszweck: Antitumor

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

#### Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, im südlichen Afrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter Nr. 6773 hinterlegt.

**Stammkultur und morphologische Beschreibung:** Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit  $\text{KNO}_3$  als einzige Stickstoffquelle, z.B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0.1%  $\text{KNO}_3$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.01%  $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.02%  $\text{FeCl}_3$ ; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sporangien (etwa 15 bis 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und  $\text{KNO}_3$ , z.B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5%  $\text{KNO}_3$ , 7.5%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.15%  $\text{FeCl}_3$  in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest.). Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben die für *Sorangium* typische Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3 - 6 µm lang und 1 µm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z.B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

#### Produktion der biologisch aktiven Verbindungen:

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 80 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Soyamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (180 upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2 NL pro m³ und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z.B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2 - 5 %) fermentiert werden.

#### Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von *Sorangium celluloseum* So ce90 (z.B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z.B.: XAD-1180, Rohm und Haas, 2 % v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z.B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingeengt und dreimal mit je 0.2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingeengt (ca. 40 g Trockengewicht).

- 9 -

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25-40  $\mu\text{m}$  (Säule: 400 x 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen ( $R_f$  ca. 95 - 125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 x 60; HD-SII-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min;  $R_f$  Epothilon A: 140 - 165 min;  $R_f$  Epothilon B: 170 - 195 min).

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

### Epothilon A



FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(M - H)^-$

$^1\text{H-NMR}$ -Daten s. Tab. 1

$^{13}\text{C-NMR}$ -Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

v: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Altufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C.  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_f$  = 5,4 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

- 10 -

**Epothilon B**

$C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^+$

$^1H$ -NMR-Daten s. Tab. 1

$^{13}C$ -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log \varepsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

$\nu$  = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1483; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $cm^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t$  = 6,3 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Tabelle 1

1H-NMR-Daten der Epothilone A und B				
Atom	A		B	
2a	2,4	dd	2,22	dd
2b	2,52	dd	2,53	dd
3	4,19	dd	4,24	dd
6	3,2	m	3,28	m
7	3,78	dd	3,75	dd
8	1,73	m	1,73	m
9a	1,4	m	1,4	m
9b	1,52	m	1,5	m
10a	1,4	m	1,4	m
10b	1,4	m	1,4	m
11a	1,42	m	1,42	m
11b	1,7	m	1,7	m
12	2,9	ddd	-	
13	3,01	ddd	2,8	dd
14a	1,85	ddd	1,9	ddd
14b	2,11	ddd	2,1	ddd
15	5,41	dd	5,41	dd
17	6,6	s	6,6	s
19	6,99	s	6,99	s
21	1,08	s	1,05	s
22	1,35	s	1,36	s
23	1,15	d	1,15	d
24	0,93	d	0,92	d
25	2,05	s	2,05	s
26	2,69	s	2,69	s
			1,28	s

\*) Zuordnung vertauschbar

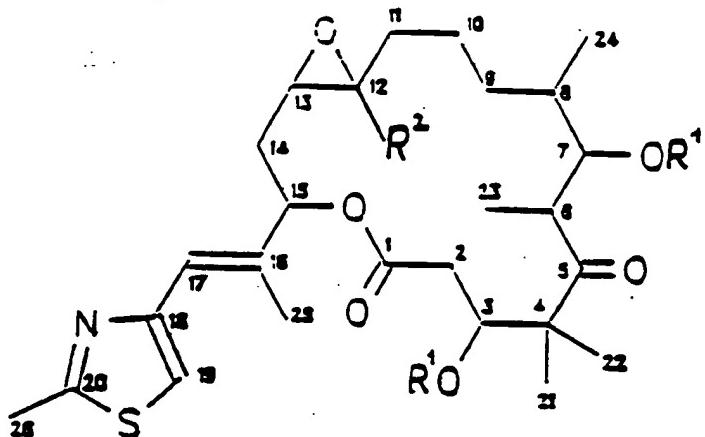
Tabelle 2

Atom	13C-NMR-Daten der Epothilone A und B	
	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21	20,4	19,7
22	21,6	21,5
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27		22,7

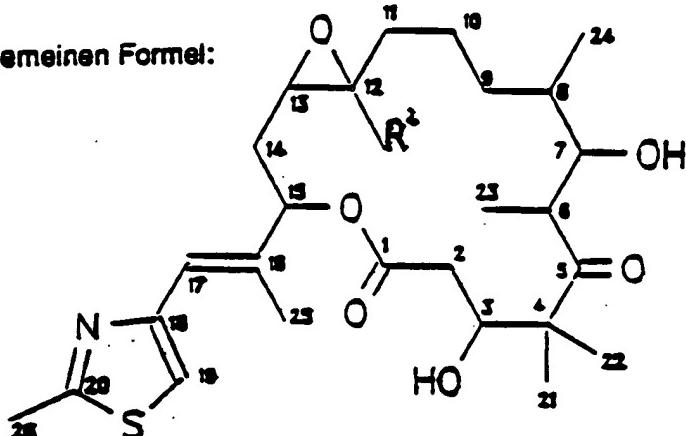
\*) Zuordnung vertauschbar

**Anwendungsbeispiel**

Nach bekannten Methoden (T. Meyer, U. Renegass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rösel, M. Müller, G. Caravatti & A. Matter: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. Int. J. Cancer 1989, 43, 851-6) wird Epothilon A auf die Hemmung der T-24 Zelllinie untersucht. Es wird ein IC<sub>50</sub> Wert von < 0.05 µM ermittelt.

**Patentansprüche****1. Epothilone der allgemeinen Formel:**

worin R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Acyl, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 1/2 Mg<sup>2+</sup> oder 1/2 Ca<sup>2+</sup> bedeutet und R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

**2. Epothilone der allgemeinen Formel:**

worin R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl ist.

**3. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:**

1H-NMR-Daten			13C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\* Zuordnung vertauschbar

- 16 -

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(\text{M} - \text{H})^-$ UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

ν: 3429; 2968; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$ DC:  $R_F = 0,75$ DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,  
braune AnfärbungHPLC:  $R_t = 5,4 \text{ min}$ Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck:

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

4. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

1H-NMR-Daten			13C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,22	dd	1	170,5
2b	2,53	dd	2	39,4
3	4,24	dd	3	72,9
6	3,28	m	4	53,2
7	3,75	dd	5	219,8
8	1,73	m	6	43,1
9a	1,4	m	7	74,3
9b	1,5	m	8	36,6
10a	1,4	m	9	30,9
10b	1,4	m	10	22,5
11a	1,42	m	11	32,3
11b	1,7	m	12	61,3
12	-		13	61,7
13	2,8	dd	14	32,4
14a	1,9	ddd	15	76,9
14b	2,1	ddd	16	137,5
15	5,41	dd	17	120,0
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,2
21*	1,05	s	20	165,1
22*	1,36	s	21*	19,7
23	1,15	d	22*	21,5
24	0,92	d	23	13,7
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,7
27	1,28	s	26	19,0
			27	22,7 (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar

- 18 -



FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

$\nu$  = 3400; 2958; 2931, 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $\text{cm}^{-1}$

DC:  $R_f = 0.75$

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschtung bei 254 nm  
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t = 6.3$  min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 85 : 35

Detektor: UV 254 nm

5. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der vor anstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Stamm So ce90

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

6. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fungizid oder Fungistatikum ist.

8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02656

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**Int. Cl. 5 C07D 493/04; C12P 17/18; A01N 43/90; A61K 31/425**  
**/(C07D493/04,313:00,303:00)(C12P17/18,C12R1:00)**  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C07D; C12P; A01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, No. 7, 18 August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No. 72218v. Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' page 1025; see abstract & JP, A, 54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19 November 1979. Compound with CM: 74226-44-1	1

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" another document not published on or after the international filing date document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claims or other special reasons (as specified)
- "C" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 February 1993 (11.02.93)	Date of mailing of the international search report 25 February 1993 (25.02.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Fax/phone No.	Authorized officer Telephone No.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/02656

Internationale Abrechnung

I. KLAUSURALIAS DES ANGEZEIGUNGSGEGENSTANDS (Bei mehreren Klausurennummern sind alle angeben)<sup>1)</sup>Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klasse(n), wenn diese ausreichend sind oder angegeben<sup>2)</sup>Int.K1. 5 C07D493/04; C12P17/18; A01N43/90; A61K31/425  
//(C07D493/04, 313:00, 303:00)(C12P17/18, C12R1:00)

## II. RECHERCHENRETE SACHEGEMEIS

Recherchierter Musteranspruch<sup>3)</sup>

Klassifikationszettel	Klassifikationszettel
Int.K1. 5 C07D ; C12P ; A01N ; A61K	

Recherchierte nicht zum Musteranspruch gehörende Veröffentlichungen, wenn diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>4)</sup>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>5)</sup>

Amt <sup>6)</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>12)</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Tabelle	Daten Ansprech Nr. <sup>13)</sup>
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 7, 18. August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' Seite 1025; siehe Zusammenfassung & JP,A,54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19. November 1979 Verbindung mit CN: 74226-44-1	1

<sup>1)</sup> Benannte Gruppen von ergänzenden Veröffentlichungen<sup>10)</sup>:

- <sup>10)</sup> Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht die bestimmten technischen Anwendungen im einen Dokument, das jedoch mit ein oder mehreren anderen Anwendungen verknüpft werden ist
- <sup>11)</sup> Veröffentlichung, die ergänzt ist, ohne Prioritätsanspruch erheben zu können, oder durch die das Verständnis einer Gruppe von Veröffentlichungen und gemeinsamer Veröffentlichung leicht werden soll oder die mit diesen anderen bestimmten Gründen verknüpft ist (siehe Anmerkung 9)
- <sup>12)</sup> Veröffentlichung, die sich auf eine einzelne Offenkundigkeit, eine Erweiterung, eine Anwendung oder andere Merkmale bezieht
- <sup>13)</sup> Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldatum, aber nach dem korrespondierenden Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- <sup>14)</sup> Spätere Veröffentlichungen, die nach dem internationalen Anmeldatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht identifiziert, sondern nur zur Veröffentlichung des der Erfindung zugehörigen Prinzipiell oder der für unerwünschtes Patent schützenswerten Theorie eingerichtet ist
- <sup>15)</sup> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die besonders in Entwicklung steht oder ein oder mehrere neue Tätigkeiten beschreibt
- <sup>16)</sup> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die besonders in Entwicklung steht oder auf erheblicher Tätigkeit beruhend beschrieben wird, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen einer Gruppe in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichung zu einem Fortschritt beigetragen hat
- <sup>17)</sup> Veröffentlichung, die Mitglied zweier Patentfamilie ist

## IV. ERSCHEINUNGSDATUM

Datum der Abschlusse des internat. Rechberichts

11.FEBRUAR 1993

Abschluss des internat. Rechberichts

25.02.93

Internationale Rechberichtsstelle

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des berichtigenden Beauftragten

VOYIAZOGLOU D.

BD

trialkylsilyl, or benzyl or phenyl (both optionally substituted by 1-6C alkoxy, 6C alkyl, OH and halo).

USE - The compounds are used in plant protectants for agriculture, horticulture and forestry, and in pharmaceuticals, especially as cytostatics (claimed). They are derived from epothilone A and B, and have cytotoxic and immunosuppressant activity.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; DERIVATIVE; USEFUL; CYTOSTATIC; PLANT; PROTECT; AGENT; EPOXY; DI; HYDROXY; TETRA; METHYL; OXO; ACID; LACTONE; DERIVATIVE

Index Terms/Additional Words: THIAZOLYL

Derwent Class: B02; B03; C02

International Patent Class (Main): C07D-493/08

International Patent Class (Additional): A01N-043/90; A61K-031/425; C07D-417/06; C07D-493/18; C07D-497/08; C07F-007/07; C07F-009/655

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-A02; C06-A02; B07-A03; C07-A03; B07-F01; C07-F01

Chemical Fragment Codes (M2):

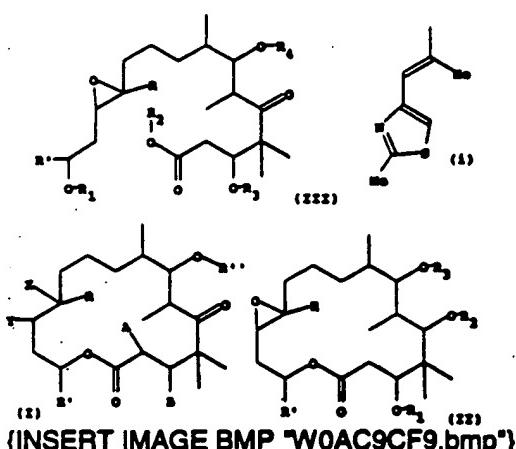
\*01\* B614 B711 B712 B720 B743 B744 B831 B832 F012 F014 F015 F016 F017

Ellipses...

M710 M903 M904 P002 P340 P431 P633 9727-00407-N 00561 40014 76869  
76870 76871 00012

Ring Index Numbers: 00561; 40014; 76869; 76870; 76871; 00012

Generic Compound Numbers: 9727-00401-N; 9727-00402-N; 9727-00403-N;  
9727-00404-N; 9727-00405-N; 9727-00406-N; 9727-00407-N



9/19/14

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI  
(c)1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

w0 93 10121

009482834 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 93-176369/199322

XRAM Acc No: C93-078740

Epithilone derivs. obtd. by cultivating sorangium cellulosum - are fungicides and fungistatic(s) for plant protection and pharmaceuticals with cyto-toxic and immunosuppressive activity

Patent Assignee: CIBA GEIGY AG (CIBA ); GBF GES BIOTECH FORSCHUNG GMBH (GBFB )

Inventor: BEDORF N; GERTH K; HOFLE G; REICHENBACH H; HOEFLE G  
Number of Countries: 023 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 4138042	A1	19930527	DE 4138042	A	19911119	C07D-493/04	199322 B
WO 9310121	A1	19930527	WO 92EP2656	A	19921119	C07D-493/04	199322
AU 9229437	A	19930615	AU 9229437	A	19921119	C07D-493/04	199340
DE 4138042	C2	19931014	DE 4138042	A	19911119	C07D-493/04	199341

Priority Applications (No Type Date): DE 4138042 A 19911119

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; JP 54038113

Patent Details:

Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent

DE 4138042 A1 10

WO 9310121 A1 G 23

Designated States (National): AU CA FI HU JP KR NO US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL  
SE

AU 9229437 A Based on

WO 9310121

DE 4138042 C2 10

Abstract (Basic): DE 4138042 A

Epothilone derivs. of formula (I) are new. In (I) R1 = H, 1-4C alkyl, 1-4C acyl, Li+, K+, Na+, 1/2Mg2+, or 1/2Ca2+; R2 = H or Me.

(I) can be prep'd. by (a) cultivating sorangium cellulosum strain So ce 90 in a medium contg. C and N source and mineral salts; (b) adding an adsorber resin either during or after cultivation; (c) sepg. the fermenter broth; (d) eluting the (I) from the adsorber resin; and (e) removing solvent(s) from the eluate immediately or after further purifcn. steps; and opt. (f) purifying and separating the various cpds. (I) by high pressure/low pressure chromatography and/or recrystallisation.

USE/ADVANTAGE - (I) can be used as plant protecting agents in agriculture, forestry and/or horticulture, esp. as fungicides or fungistatics. (I) can also be used as therapeutic agents which esp. have cytotoxic activity and/or immunosuppressive activity. No further details of the activity given.

ber

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): DE 4138042 C

Epothilone cpds. of formula (I) are new. R1 is H, 1-4C alkyl, 1-4C acyl, Li, K, Na, 1/2 Mg or 1/2 Ca; and R2 is H or CH3. Two epothilones, with specified NMR spectra (1H and 13C), IR spectrum etc.; and empirical formulas C26H39NO6S (493) and C27H41NO6S (507) are specifically claimed.

(I) are prep'd. by culturing strain So ce 90 in a medium contg. a source of C and N, and minerals; adding adsorbent resin; removing the ferment broght, eluting (I) from the resin removing solvent; etc.; and purifying and separating the (I) by HP/LP chromatography and/or recrystallisation.

USE/ADVANTAGE - (I) are plant-protective agents and therapeutics with cytotoxic and immunosuppressive properties (claimed).

Dwg.0/0

Title Terms: DERIVATIVE; OBTAIN; CULTIVATE; SORANGIUM; CELLULOSUM; FUNGICIDE; FUNGICIDE; PLANT; PROTECT; PHARMACEUTICAL; CYTO; TOXIC; IMMUNOSUPPRESSIVE; ACTIVE

Derwent Class: B02; C02; D16

International Patent Class (Main): C07D-493/04

International Patent Class (Additional): A01N-043/90; A01N-063/02;

A61K-031/425; C07G-011/00; C12P-017/18; C07D-303-00; C07D-313-00;

C07D-493/04; C12R-001-00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-A03; C06-A03; B12-A02C; C12-A02C; B12-D02B;

C12-D02B; D05-C

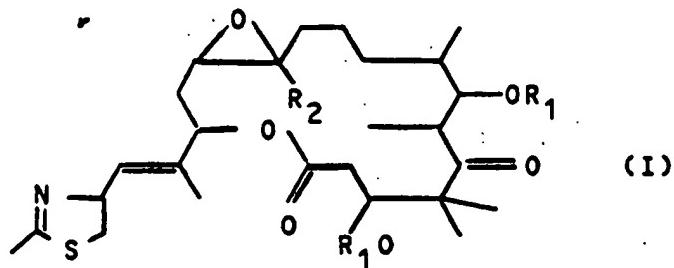
Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* D015 D016 D030 D160 F012 F014 F710 H401 H402 H421 H422 H521 H522 H7  
H721 J5 J522 L472 L499 L9 L942 M1 M126 M133 M210 M211 M212 M213 M214  
M215 M216 M231 M232 M233 M240 M272 M281 M282 M283 M313 M321 M331  
M342 M412 M511 M521 M530 M540 M710 M903 M904 P001 P241 P433 P633  
Q233 9322-02501-N 40014

Ring Index Numbers: 40014

Generic Compound Numbers: 9322-02501-N

{INSERT IMAGE BMP "W090B252.bmp"}



50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 14 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
ACCESSION NUMBER: 1997:443365 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 127:81289  
TITLE:  
INVENTOR(S): Preparation of epothilone derivatives as agrochemicals and pharmaceuticals  
PATENT ASSIGNEE(S): Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael  
Gesellschaft Fur Biotechnologische Forschung Mbh (Gbf), Germany; Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael  
SOURCE: PCT Int. Appl., 38 pp.  
DOCUMENT TYPE: CODEN: PIXXD2  
LANGUAGE: Patent  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: German 2  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
WO 9719086	A1	19970529	WO 96-EP5080	19961118
W: JP, US				
RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,				
PT, SE				
DE 19542986	A1	19970522	DE 95-19542986	19951117
DE 19639456	A1	19980326	DE 96-19639456	19960925
EP 873341	A1	19981028	EP 96-939097	19961118
R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE, MC,				
PT, IE, FI				
PRIORITY APPLN. INFO.:			DE 95-19542986	19951117
			DE 96-19639456	19960925
			WO 96-EP5080	19961118

## OTHER SOURCE(S):

AB The title compds., e.g., I [R = H, C1-4 alkyl; R1, R2 = H, C1-6 alkyl, C1-6 acyl, benzoyl, C1-4 trialkylsilyl, benzyl, Ph, C1-6 alkoxy, C6 alkyl-, hydroxy-, and halo-substituted benzyl or phenyl; X, Y = H, halo, pseudohalo, OH, acyloxy, alkoxy, benzyloxy; or YZ = O, bond; however, I may not be epothilone A or B], useful as agrochems. and pharmaceuticals (no data), are prep'd. Thus, epothilone A in acetone contg. trifluoroacetic acid was heated overnight at 50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 15 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
ACCESSION NUMBER: 1994:52841 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 120:52841  
TITLE:  
INVENTOR(S): Epothilone derivatives  
Hofle, Gerhard; Bedorf, Norbert; Gerth, Klaus;  
Reichenbach, Hans  
PATENT ASSIGNEE(S): Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Germany  
Ger. Offen., 10 pp.  
SOURCE: CODEN: GWXXBX  
DOCUMENT TYPE: Patent  
LANGUAGE: German  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
DE 4138042	A1	19930527	DE 91-4138042	19911119
DE 4138042	C2	19931014		
WO 9310121	A1	19930527	WO 92-EP2656	19921119
W: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US				
RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE				
AU 9229437	A1	19930615	AU 92-29437	19921119
PRIORITY APPLN. INFO.:				
DE 91-4138042 19911119				
WO 92-EP2656 19921119				
OTHER SOURCE(S): MARPAT 120:52841				
AB Fungicidal antibiotic epothilones I (R1 = H, alkyl, acyl, Li, etc.; R2 = H, Me) and a fermentative process for their prepn. are claimed. The process for their prepn. comprises the fermn. of Sorangium cellulosum in the presence of a resin. During the fermn. epothilon A (R1 = R2 = H) and epothilone B (R1 = H, R2 = Me) are bound to the resin. Agrochem. fungicides contg. epothilone A and epothilone B				